



RASTREIO NEONATAL DE INFECÇÃO CITOMEGÁLICA

CATARINA RAQUEL ADRIÃO MACHADO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

JANEIRO DE 2016



RASTREIO NEONATAL DE INFECÇÃO CITOMEGÁLICA

Catarina Raquel Adrião Machado

Orientador: Professor Doutor Paulo Paixão

Co-orientador: Mestre Maria de Jesus Chasqueira

Unidade de Infecção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Microbiologia
Médica

JANEIRO DE 2016

Apresentação Científica efetuada no âmbito deste trabalho

Poster:

Rastreio neonatal de infeção citomegálica através da utilização de pools de urina.

Catarina Machado, Maria de Jesus Chasqueira, Graça Henriques, Paula Garcia, Rita Ventura, Paulo Paixão. Outubro 2015. 14º Encontro Nacional de Atualização em Infeciologia. Porto, Portugal. (Anexo I)

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Paixão, pela forma como orientou a presente dissertação, pela atenção, disponibilidade, pelos ensinamentos, críticas e sugestões. Pela oportunidade de fazer a dissertação numa das áreas que mais aprecio em Microbiologia.

À co-orientadora, Mestre Maria de Jesus Chasqueira, pela paciência, motivação, amabilidade e compreensão sempre demonstradas. Pelo importante papel na conclusão deste trabalho, dedicação e persistência até ao último dia.

À equipa do Hospital da Luz, em especial às enfermeiras Maria João e Catarina, pela disponibilidade, apreço e amabilidade, sempre demonstrada.

À equipa de neonatologia da Maternidade Alfredo da Costa.

Ao grupo Unidade de Infecção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, em especial à Lúcia e à Augusta, pela ajuda e momentos de boa disposição.

À minha grande família, sem a qual não seria possível chegar até aqui. Por todo apoio, carinho e dedicação que sempre manifestaram em todo o meu percurso académico e também ao longo da vida. Vocês são os Melhores.

Às minhas Jô e Marilu pelos momentos muito bons e menos bons que passámos juntas. Fizem com que este mestrado fosse uma boa experiência, quer a nível profissional quer pessoal. Obrigada pelos jantares, saídas, conselhos, apoio, conversas e muitas gargalhadas! Amizades para a vida!

Aos meus amiguinhos Fábiozinho, Fátinha e Catarina, que muito facilitaram as horas de estudo e escrita, sempre com boa disposição, interajuda e bons conselhos. Também pelos jantares, almoços e boas conversas! Estamos Juntos!

Ao Ricardo pelo apoio, companheirismo e dedicação. Obrigado pelo incentivo quando mais precisei, da palavra certa na hora certa, por insistires e não desistires, e por teres acreditado sempre em mim, mesmo quando eu não acreditava (por me aturares, basicamente). Apesar da distância, conseguiste com que esta parecesse sempre curta.

Um obrigado a Coimbra, por tudo o que me proporcionou.

Resumo

O vírus citomegálico humano (CMV) é o principal agente de infecção congénita. Em Portugal, os estudos publicados apontam para uma prevalência desta infecção entre 0,7% e 1,1%. A importância do rastreio desta infecção é reconhecida desde há vários anos, mas as condições para a sua realização, de forma que seja técnica e economicamente viável, ainda não estão reunidas. A metodologia de *pools* de urina descrita por uma equipa portuguesa, revelou uma correlação total com os resultados obtidos pelo método de referência, a cultura celular, e permite uma redução bastante significativa, quer nos tempos de execução quer nos custos em reagentes, abrindo assim a possibilidade efetiva de utilizar esta técnica para o rastreio da infecção congénita.

Este estudo tem como primeiro objetivo rastrear recém-nascidos do Hospital da Luz e Maternidade Alfredo da Costa num determinado período de tempo, no sentido de determinar a prevalência da infecção congénita por CMV nessa população. O rastreio tem como base a utilização de *pools* (20 urinas) e a deteção de DNA viral por PCR em tempo real. As 20 urinas de cada *pool* positiva são posteriormente testadas individualmente. O segundo objetivo deste trabalho foi a deteção de carga viral de CMV, por PCR em tempo real, a partir de uma fralda com urina CMV positiva.

Como resultados, obtiveram-se 45 *pools*, 4 delas positivas com uma urina positiva em cada *pool*, sendo a prevalência deste rastreio 0,44%. Esta metodologia confirmou a sua utilidade para um rastreio universal de infecção congénita por CMV, no entanto verificaram-se dificuldades na aplicação da mesma, o que deverá ser tomado em consideração na implementação de um eventual programa de rastreio.

Os resultados obtidos na extração de urina CMV positiva através de fraldas de recém-nascidos foram muito promissores, o que abre a possibilidade da sua utilização para o diagnóstico da infecção congénita.

Abstract

The human cytomegalovirus (CMV) is the main agent of congenital infection. In Portugal, this infection has shown a prevalence of 0.7 to 1.1%. The importance of the screening of this infection is well recognized for several years now, but the economic viability of its usage is not yet assured. The urine pool technique, described by a Portuguese team, revealed a total correlation with the results obtained by the gold standard method (cell culture) and allows a very significant reduction of the time and cost of the procedure. Therefore, this technique could be used for congenital CMV screening. The main purpose of this study was the screening of congenital CMV infection in newborns from Hospital da Luz and Maternidade Alfredo da Costa in a specific period of time and the determination of its prevalence. The screening is based on the analysis of pools made of 20 urines and viral DNA detection by real time PCR. In the positive pools, the 20 samples were then individually tested to determine which one was positive. The second purpose of this study was the detection and quantification of viral CMV DNA by real time PCR from a diaper with positive urine for CMV. In our screening, we analysed 45 pools of which 4 were positive with one positive urine each and we concluded that the prevalence of congenital CMV infection was 0,44%. With these results, we were able to show that this technique can be used for universal screening but we also verified some difficulties in its application which should be considered in future studies. The results obtained from the extraction of the urines collected from the diapers were very promising, showing that this technique could be used for congenital CMV infection diagnosis.

Índice

Apresentação científica efetuada no âmbito deste trabalho	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iv
<i>Abstract</i>	v
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
1. Introdução	
1.1. História.....	1
1.2. Taxonomia	2
1.3. Estrutura.....	2
1.4. Replicação viral do CMV	2
1.5. Epidemiologia.....	3
1.6. Apresentação clínica	5
1.6.1. Infecção congénita e perinatal	6
1.7. Diagnóstico de infeção congénita	8
1.8. Objetivos do trabalho experimental	14
2. Material e métodos	
2.1. Rastreio neonatal para CMV com recurso à utilização de <i>pools</i> de urina	15
2.1.1. População em estudo	15
2.1.2. Amostras	15
2.1.3. Processamento das amostras	15
2.1.4. Extração de DNA.....	16
2.1.5. PCR em tempo real	17

2.1.5.1. Critérios de validação e interpretação dos resultados de PCR em tempo real	19
2.1.6. Método de <i>nested</i> PCR	19
2.1.7. Determinação da prevalência da infecção congênita pelo vírus citomegálico humano	21
2.2. Detecção de CMV com recurso à utilização de fraldas.....	21
2.2.1. Amostras	21
2.2.2. Processamento das amostras a partir de fralda seca	21
2.2.2.1. Estudo da sensibilidade	23
2.2.3. Processamento das amostras a partir de fralda de recém-nascido	23
3. Resultados e discussão	
3.1. Rastreio neonatal para CMV com recurso à utilização de <i>pools</i> de urina	24
3.2. Detecção de CMV com recurso à utilização de fraldas.....	26
4. Conclusões	32
5. Referências bibliográficas.....	33
Anexo I	39
Anexo II	40

Índice de Figuras

Figura 1- Seroprevalência da infecção por CMV na gravidez. (Adaptado [17])	5
Figura 2- Princípio do funcionamento do SYBR-Green®	12
Figura 3- Princípio de funcionamento das sondas TaqMan®	13
Figura 4 - Ciclo de amplificação da PCRtr.....	18
Figura 5 - Algoritmo utilizado na análise das <i>pools</i> de urina: quando o resultado da PCRtr das 20 urinas (<i>pool</i>) foi negativo, as 20 urinas são consideradas negativas; quando o resultado do PCRtr das 20 urinas foi positivo, realizou-se novo PCRtr com as 20 urinas individualizadas.	18
Figura 6 - Preparação dos discos com uma urina positiva.....	21
Figura 7 - Esquematização do processo de extração da urina da fralda.	22
Figura 8 - Preparação dos discos a partir de uma fralda de recém-nascido à qual se adicionou uma urina positiva.	23
Figura 9 - Resultados da <i>Nested-PCR</i> . Electroforese em gel de agarose a 1.5%, correspondentes às urinas 11.1.1 e 11.1.2, em duplicado, e respectivos CI, controlo negativo (C-) e positivo (C+; AD-169).....	25
Figura 10 - Resultados da PCRtr de diluições seriadas de uma <i>pool</i> positiva com uma carga inicial de $4,79 \times 10^9$ cópias/mL em que foi possível a deteção até à diluição 10^{-5} com uma carga correspondente de $3,73 \times 10^3$ cópias/mL.	26

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resultados da PCRtr das <i>pools</i> de urina e respectivas amostras individuais. .	24
Tabela 2 - Resultados de PCRtr para as primeiras onze <i>pools</i> (20 urinas), e respectivas subdivisões em <i>pools</i> (10 urinas).....	25
Tabela 3 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (D) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($3,2 \times 10^7$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: D1.1; D1.2; D1.3). Nas amostras negativas a extração e a PCRtr foram repetidas. (AI – Amostra insuficiente)	27
Tabela 4 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (C) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($4,4 \times 10^5$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: C1.1; C1.2; C1.3). Nas amostras negativas a extração e a PCRtr foram repetidas.	28
Tabela 5 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (A) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($3,2 \times 10^7$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: A1.1; A1.2; A1.3).....	29
Tabela 6 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (A) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($3,9 \times 10^5$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: B1.1; B1.2; B1.3).....	30
Tabela 7 – Resultados da PCRtr dos discos recortados de fraldas com urina de recém-nascidos (n=7), às quais se adicionou previamente 1mL de uma urina positiva ($3,4 \times 10^6$ cópias/mL de CMV).	30

Abreviaturas

°C	Grau centígrado
μL	Microlitro
CID	Doença de inclusão citomegálica
Cm	Centímetro
CMV	Vírus citomegálico humano, do inglês <i>cytomegalovirus</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleósidos Trifosfatos
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
g	Aceleração da gravidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
Ig G	Imunoglobulina da classe G
Ig M	Imunoglobulina da classe M
kpb	Kilo par de base
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCRtr	Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês <i>Real time PCR</i>
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TA	Temperatura ambiente
Tm	Temperatura de dissociação, do inglês <i>melting temperature</i>
Tris-HCL	Tris-hidrocloreto
U	Unidade enzimática

1. Introdução

1.1. História

Pela primeira vez em 1904, Jesionek e Kiolemenoglu descreveram as infeções causadas pelo vírus citomegálico humano. Estes autores descreveram células com inclusões intranucleares, sugerindo a presença de um parasita, nos pulmões, rins e fígado de um nado-morto. Na década de 20, verificou-se semelhanças histológicas provocadas pelos agentes da varicela, do herpes genital e deste novo agente. Em 1950, Wyatt e colaboradores sugeriram “doença de inclusão citomegálica-CID”, no entanto a etiologia do vírus era desconhecida[1]. Margaret Smith, em 1956, “recolheu” o primeiro isolado de CMV a partir de um tecido da glândula salivar do submaxilar de um beb  morto e o segundo isolado de tecido renal de um beb  a morrer de doença citomegálica [2]. Em 1960, foi atribuído o nome de Cytomegalovirus de acordo com os efeitos produzidos nas células em cultura [3]. No mesmo ano, Rowe e colaboradores, que trabalhavam com adenovírus, observaram efeitos citopáticos em culturas de tecido adenóide em três crianças assintomáticas [4]. O efeito citopático da nova estirpe do vírus (AD169)   muito idêntica à estirpe *Davis* que foi observada um ano mais tarde por Weller e os seus colaboradores em culturas de tecido muscular embrionário humano inoculadas com biopsia de fígado de uma criança de 3 meses de idade com microcefalia, icterícia, hepatoesplenomegalia, coriorretinite e calcificações cerebrais. O mesmo grupo de investigadores isolou duas estirpes adicionais de CMV, *Kerr* e *Esp* [5]. O CMV é um vírus com grande diversidade patog nica, que nos extremos pode causar infeções letais ou ser um companheiro silencioso ao longo da vida. Estes dois aspetos foram confirmados por Thomas Weller em 1970, a partir do isolamento das primeiras estirpes de CMV[6]. Num estudo, Rowe descreveu que a seroprevalência era elevada para CMV, e que aumentava gradualmente com a idade, revelando que o CMV é comum na espécie humana. Ao longo dos anos o CMV mostrou as suas propriedades patog nicas em pacientes com órgãos transplantados, em doentes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), em pacientes oncológicos, sendo ainda o principal agente de infeção congénita.

Existe atualmente tratamento antivírico para a infecção por CMV, sobretudo nos pacientes imunocomprometidos [7].

1.2. Taxonomia

CMV é um vírus que pertence à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, que se divide em três sub-famílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*. O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) classificou o CMV como espécie *Human herpesvirus 5*, e o vírus foi incluído na sub-família *Betaherpesvirinae*, no género *Cytomegalovirus* [8], [9].

1.3. Estrutura

O CMV tem as características estruturais típicas da família dos herpesvírus. A estrutura baseia-se nos seguintes constituintes, o genoma viral de cadeia dupla, é relativamente grande (230kpb), sendo delimitado por uma cápside com aproximadamente 116nm de diâmetro, composta por capsómeros. A cápside está rodeada por um revestimento proteico amorfo chamado tegumento, que por sua vez é envolto por uma bicamada lipídica com glicoproteínas, formando o invólucro [9], [10].

O genoma está dividido em duas sequências ou regiões denominadas “curta” e “longa” (*Unique short sequence and Unique long sequence*), que podem estar orientadas em dois sentidos, de onde resulta a possibilidade de aparecimento de quatro isómeros. Os genes são numerados de acordo com a posição que têm nos isómeros e das proteínas que eles codificam, *p* para proteína, *pp* para fosfoproteína e *gp* para glicoproteína. Por exemplo, *gpUL75* significa uma glicoproteína produzida na sequência longa na posição 75 [11].

1.4. Replicação viral do CMV

A transcrição, a replicação do genoma e a formação da cápside ocorrem no núcleo da célula hospedeira. Para que o processo de replicação viral ocorra são precisos genes que serão replicados numa ordem específica:

- 1) Os genes precoces inmediatos (*immediate-early*), que codificam as proteínas reguladoras, que por sua vez são proteínas não estruturais;
- 2) Os genes precoces (*early*), que codificam as enzimas essenciais para a replicação do DNA viral, como a pUL54, uma DNA polimerase;
- 3) Os genes tardios (*late*), que codificam as proteínas estruturais, proteínas que fazem parte da cápside e do invólucro. As primeiras são sintetizadas no citoplasma das células, onde se concentram no núcleo para formarem a cápside que envolverá o DNA já replicado, este processo é designado por encapsidação. As segundas proteínas estruturais formam glicoproteínas que se encontram na membrana nuclear [12].

O tegumento e o invólucro são adquiridos, através de vesículas constituídas pela membrana nuclear ou do retículo endoplasmático. O vírus é transportado para a membrana celular através do complexo de Golgi, e a célula hospedeira quando entra em lise celular, liberta por exocitose o vírus já maduro, virião. Alternativamente, por processo de seleção celular, o vírus pode ser mantido em estado latente. O genoma viral que fica em estado latente pode reativar a qualquer momento, no entanto o mecanismo de reativação ainda não é conhecido [9], [10].

É importante referir também que o CMV demonstra a capacidade de infectar *in vivo* um largo espectro de células. De acordo com Sinzger, células epiteliais, células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e os fibroblastos, parecem ser permissivas para a replicação do CMV em cultura celular. Contrariamente, as células polimorfonucleares só expressam o gene IE, o que significa que foram infectadas abortivamente ou seja, não completaram as etapas de replicação do vírus [13].

1.5. Epidemiologia

A transmissão do vírus é inter-humana. O CMV penetra nas mucosas ou é adquirido por via hematogénica. A transmissão ocorre através de contato direto ou indireto com urina, saliva, secreções orofaríngeas, secreções endocervicais, esperma, leite materno, lágrimas, produtos sanguíneos ou órgãos transplantados. As primeiras células a serem infectadas são as células endoteliais e os leucócitos, sendo que a propagação no organismo feita por via hematogénica [14], [15].

O termo transmissão vertical é utilizado para indicar a transmissão do vírus da mãe para o feto durante a gravidez (infecção congénita) e a transmissão do vírus da mãe ao recém-nascido (infecção perinatal) [16–20]. CMV é a causa mais comum de infecção viral congénita nos países desenvolvidos, afetando 0,5-2% das gravidezes nos Estados Unidos e Europa [21, 22].

A infecção primária materna é a principal responsável pela transmissão congénita deste vírus [7].

Devido à latência do vírus após a infecção primária e à reactivação periódica da replicação do CMV, também existem infecções recorrentes.

As infecções recorrentes podem consistir na reativação do vírus que causou a infecção primária ou a reinfeção por uma nova estirpe do vírus. Recentemente a incidência de infecções congénitas sintomáticas em mães imunes tem mostrado ser semelhante à da infecção materna primária [23]. Além disso, as infecções congénitas sintomáticas parecem ser causadas por reinfeção de mães imunes durante a gravidez por uma nova estirpe de CMV [24]. Esta conclusão baseou-se no aparecimento de anticorpos dirigidos contra novos epítomos da glicoproteína H do CMV que não se encontram presentes no sangue antes da gravidez. Por outro lado, as infecções congénitas por infecção materna cuja origem foi a reativação na mãe são principalmente assintomáticas [25], embora a verdadeira frequência e a importância clínica destas infecções continue a ser objeto de estudos. A infecção por CMV é endémica, que ocorre durante todo o ano e sem variações sazonais. As percentagens de seropositividade na população variam de acordo com os fatores geográficos, étnicos e com as condições socioeconómicas (Figura 1). A predominância dos anticorpos específicos para CMV aumenta com a idade e nos grupos socioeconómicos menos favorecidos dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A seroprevalência nas mulheres férteis varia consoante estes fatores epidemiológicos. As prevalências disponíveis mostram uma grande heterogeneidade, 52% nos Estados Unidos, 99% na Turquia, 43,5-51,5% em França e 77% em Portugal. A prevalência de infecções primárias por CMV em grávidas varia com as condições socioeconómicas. Quanto a infecções secundárias, não existem muitos dados [14]. A prevalência de infecções congénitas por CMV de todos os recém-nascidos varia aproximadamente entre os 0,2 e 2,2% [16–18]. A maior parte das estimativas provêm de estudos realizados na Europa, Estados Unidos e Japão. Nos países em desenvolvimento a prevalência de infecções congénitas por CMV varia substancialmente, tendo valores tão elevados como

6-14% [19,20]. Em Portugal a prevalência apresenta um valor de 1,1%. Estes dados significam que em 110 000 nados-vivos nascidos em Portugal por ano, 1 210 ter o infeção congénita por CMV [8].

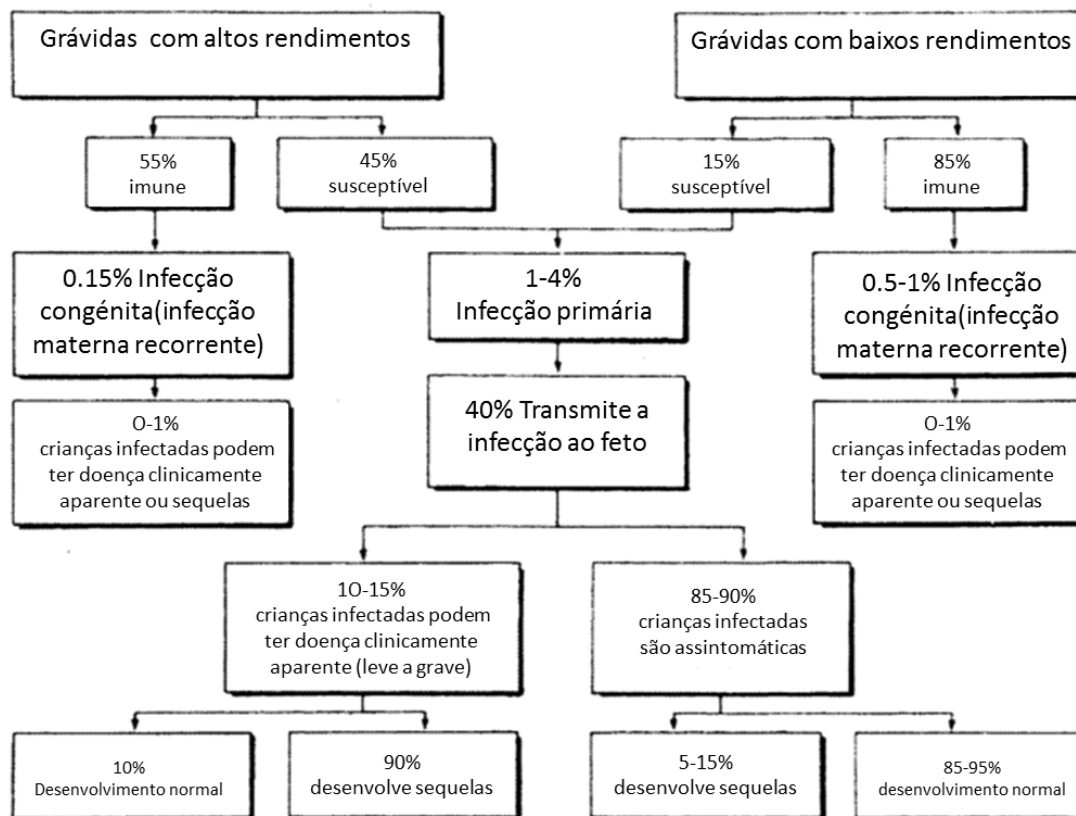


Figura 1- Seroprevalência da infeção por CMV na gravidez. (Adaptado [35])

1.6. Apresentação clínica

Estima-se que o período de incubac  o seja entre as 3 e 12 semanas, desde o momento da infeção pelo CMV até ao aparecimento dos primeiros sinais e sintomas, sendo estes inespecíficos de uma infeção por CMV. Os sinais clínicos da infeção por CMV variam com a idade e imunocompetência. A maioria das infeções primárias são assintomáticas ou, por vezes, apresentam-se como uma síndrome mononucle sica no hospedeiro imunocompetente.

Em alguns grupos de risco, como indivíduos transplantados e indivíduos infetados pelo HIV, a infeção por CMV pode ter consequências graves. A taxa de reinfe   es é muito mais elevada para estes grupos de risco do que para os indivíduos imunocompetentes [14], [30]. A infeção por CMV é uma infeção oportunista comum nos indivíduos com

HIV, podendo resultar a lesão de órgãos ou tecidos, sendo a retinite uma manifestação comum nestes indivíduos (21-45% dos pacientes) [31].

No caso dos transplantados, a manifestação da infecção por CMV depende do órgão transplantado. Em doentes transplantados os efeitos do CMV podem dividir-se em três grupos:

- Síndromas infecciosas – as manifestações clínicas vão desde a infecção assintomática às infecções severas e até mesmo potencialmente letais. Normalmente o quadro clínico consiste na “síndrome do CMV em transplantados de órgãos sólidos”, que é caracterizado pela presença de febre, leucopenia ou trombocitopenia, acompanhadas da deteção de CMV no sangue. Para além disso, em transplantados de medula óssea a infecção pode originar uma pneumonia com elevada mortalidade e no caso dos transplantados hepáticos, pancreáticos, pulmonares e cardíacos, a hepatite, a pancreatite, a miocardite e a pneumonia ocorrem respetivamente com maior probabilidade [32].

- Potenciador de outras infeções oportunistas – devido ao seu efeito imunossupressor, o CMV potencia o efeito de imunossupressão iatrogénica. Pensa-se ser esta a explicação para a associação entre a infecção citomegálica e o aparecimento de outras infeções oportunistas.

- Rejeições do enxerto – destacam-se duas situações: rejeição precoce do enxerto em transplantados renais e rejeição crónica em transplantados cardíacos[12].

1.6.1. Infecção congénita e perinatal

A infecção congénita por CMV ocorre quando o vírus, a partir da mãe, atravessa a placenta e afeta um feto ainda imaturo imunologicamente [33]. Durante a gravidez, uma mulher pode contrair o vírus pela primeira vez, ao que se chama de primeira infecção por CMV, ou então pode já ter sido infetada e haver uma reativação do vírus latente ou ainda uma reinfeção por uma nova estirpe viral. Embora a frequência de transmissão vertical e a severidade de infecção seja maior se for uma infecção primária, a reinfeção ou a reativação são mais comuns que as infeções primárias, pelo que contribuem para um maior número de casos de infecção congénita por CMV [22], [34].

Embora os riscos de infecção por CMV para o desenvolvimento do feto e recém-nascido sejam bem conhecidos, os fatores que determinam ou não se uma criança tem uma

infeção assintomática ou manifesta uma doença grave, ainda não estão claros. A protecção imunitária contra a infeção congénita por CMV é um complexo que requer a consideração das respostas imunitárias na mãe do feto e na placenta. Também se deve ter em conta a crescente lista de modulação imunológica codificada pelo vírus e genes de evasão imune, que certamente exercem um impacto clinicamente revelante na resposta materna e fetal à infeção [34]. Em 1985, Stagno e Whitley estimaram o risco materno em contrair infeção primária ou recorrente de CMV, bem como o risco de transmissão intra-uterina para o feto em dois grupos de mulheres, de baixo e de alto nível socioeconómico (Figura 1). As estimativas mostraram que a susceptibilidade da mãe ao contrair infeção primária é três vezes maior em mulheres de alto nível socioeconómico (45%), comparado com 15% do grupo com baixos rendimentos. Em ambos os grupos, a transmissão ao feto ocorre em cerca de 40% dos casos, destes 10 a 15% são sintomáticos e 85 a 90% são recém-nascidos assintomáticos. Entre os recém-nascidos assintomáticos, cerca de 10% desenvolvem sequelas, enquanto cerca de 90% das crianças que são assintomáticas à nascença desenvolvem-se normalmente. Por outro lado, a taxa de infeção congénita nas infeções maternas recorrentes é de 0,15% no grupo de grávidas de alto nível socioeconómico, e 0,5 a 1% no grupo de baixo rendimentos, ou seja, 3 a 7 vezes maior. No entanto, a taxa de doença clinicamente observada foi baixa e semelhante ($\leq 1\%$) nos dois grupos [35].

Nos recém-nascidos as infeções congénitas podem causar a morte do feto, em casos mais extremos, ou provocar sequelas graves, incluindo a perda auditiva neurosensorial, paralisia cerebral, microcefalia, incapacidade cognitiva e atraso mental [36]–[38]. Podem ainda manifestar-se com hepatosplenomegalia, trombocitopenia, hepatite colestatica, petéquias e purpura e pneumonia [39]. Além do risco de contrair doenças graves, as crianças com sintomas no nascimento, têm um risco aumentado para sequelas no desenvolvimento neurológico a longo prazo, incluindo a perda auditiva neurosensorial.

O prognóstico do desenvolvimento neurológico de um recém-nascido com infeção congénita depende de vários factores, incluindo o estado imunológico materno no início da gestação, se ela foi ou não re-infectada com uma nova estirpe de CMV durante a gravidez, e o tempo de aquisição da infeção fetal [16], [40], [41].

As infeções perinatais são frequentes, sendo que a transmissão resulta do contato com as secreções genitais durante a passagem pelo canal do parto ou com o leite materno

durante a amamentação. A amamentação é a principal fonte de infecção do CMV no primeiro ano de vida [42]. As infecções perinatais são habitualmente assintomáticas no recém-nascido de termo e não apresentam sequelas como as descritas para infecção congénita [43]. No entanto a infecção pós-natal pelo CMV pode também causar morbidade significativa e mortalidade ocasionalmente, mas este pode ser um problema substancial para os bebés prematuros com pouco peso [44], [45].

Não existe nenhum tratamento para a infecção primária por CMV durante a gravidez, embora decorram ensaios nesse sentido. Alguns estudos mostram que o tratamento com antivíricos têm um papel benéfico para o tratamento de recém-nascidos com infecção congénita sintomática [46]. O desenvolvimento de uma vacina contra a infecção congénita por CMV é uma prioridade de saúde pública, podendo a infecção no feto não ocorrer, se a infecção materna for impedida por uma vacina bem-sucedida [47], [48]. Entender o mecanismo da resposta imune do feto infetado pelo vírus pode facilitar a identificação de correlações na imunidade protetora na criança. Além disso é importante notar que muitas vacinas de CMV atualmente em ensaios clínicos estão focadas na indução de respostas imunitárias que se sabe serem importantes no controlo da infecção por CMV em órgãos e pacientes de transplante de células estaminais hematopoiéticas. No entanto, este controlo em pacientes transplantados pode ser ou não relevante para o problema da prevenção de infeções por CMV no feto ou na mãe [49].

Como não existem vacinas disponíveis e os tratamentos com fármacos também não são recomendados a grávidas, é importante implementar o rastreio do CMV e reduzir o risco de exposição das grávidas ao vírus. As recomendações gerais que são dadas incluem boas práticas de higiene pessoal, com especial atenção à lavagem das mãos com água e sabão após o contato com fraldas ou secreções orais, sobretudo com crianças que estão na creche. São medidas simples mas importantes para diminuir o risco de transmissão do CMV [50].

1.7. Diagnóstico de infecção congénita

De longe, o fator principal de transmissão do vírus de CMV ao feto é a infecção primária da mãe durante a gravidez. Assim sendo, o diagnóstico de infecção primária durante a gravidez é muito importante. No entanto, é impossível fazer um diagnóstico de infecção

só a partir dos sintomas, embora possam existir alguns sinais, ainda que inespecíficos, que permitam a suspeita de uma infecção existente [14].

O diagnóstico de infecção primária por CMV é determinado quando a seroconversão é documentada, por exemplo quando há o aparecimento de IgG específica do vírus no sangue de uma grávida que foi previamente seronegativa. No entanto esta abordagem só é viável quando há um programa de rastreio adotado a todas as mulheres seronegativas já identificadas e previamente monitorizadas. Assim a deteção de IgG específicas no sangue de uma grávida, na ausência de determinação de anticorpos antes da gravidez, não permite o diagnóstico de infecção primária. Anticorpos IgM específicos para o CMV devem ser determinados para esse fim e embora a deteção das IgM não seja suficiente por si só para o diagnóstico de infecção primária de CMV (IgM também pode ser detetada durante a reativação), a infecção primária é consistentemente associada com a presença de uma resposta de anticorpos IgM específicos do vírus. Assim, em grávidas a deteção de anticorpos IgM de CMV pode estar relacionada com uma infecção primária que ocorre durante a gravidez, quando a afeição das IgG é determinada para confirmação e esta se encontra baixa [7].

Contudo para o diagnóstico definitivo de infecção fetal, é necessária a cultura do vírus ou a amplificação do genoma viral no líquido amniótico obtido por amniocentese. O vírus atinge o líquido amniótico através da infecção do rim do feto, que é excretado pela urina fetal. Em média o processo de excreção dura seis a oito semanas. Para limitar os falsos positivos deve-se respeitar este intervalo de tempo para se fazer a amniocentese. Por isso a amniocentese deve ser feita depois das 22 semanas de gestação para que a diurese do feto esteja bem estabelecida. O DNA viral pode ser amplificado por PCR, a sensibilidade desta técnica varia entre os 50 e 100% e a especificidade entre 67 e 100%. Por outro lado a cultura viral tem a sensibilidade entre 50 e 80% e a especificidade de 98 a 100%, mas o resultado é demorado (± 14 dias) [51]–[55].

Existem métodos de cultura rápidos, como o método *shell vial*, com uma sensibilidade e especificidade comparável ao padrão da cultura celular, com resultados entre as 24 e 36 horas. As percentagens da sensibilidade para a técnica de PCR, é sustentada pelas condições inapropriadas de colheita do líquido amniótico (respeitar o período de excreção de urina fetal), e também pelas diferentes técnicas de PCR utilizadas. Qualquer que seja a técnica no diagnóstico pré-natal, a investigação viral é sempre confirmada à nascença, como se verá mais à frente. Se houve deteção viral no líquido

amniótico, mas negativa ao nascimento, então podemos dizer que é um falso positivo. Neste caso, pode considerar-se que houve contaminação do líquido amniótico por sangue materno durante a amniocentese, se a mãe tivesse virémia na altura da colheita, ou então uma contaminação do líquido amniótico no procedimento em laboratório. A técnica de PCR em tempo real veio diminuir o risco de contaminação, sem o anular, o mesmo se verificando com a automatização da extracção da PCR [51]–[55].

O melhor método para avaliar o bem-estar do feto é a ecografia obstétrica. Por este método podem observar-se as lesões ecográficas classicamente associadas a esta infeção. No entanto, mesmo numa população de risco, o valor preditivo da ecografia está longe do ideal, pois há fetos infetados mas que no entanto não apresentam alterações ecográficas, e existem certas anomalias que podem ser transitórias e já terem desaparecido na data de realização da ecografia. Um dos sinais visíveis na ecografia é o aumento da espessura da placenta, com um aspeto globalmente heterogéneo, por vezes com calcificações que coexistam com zonas com menor densidade, entre outros. Por fim, a restrição de crescimento intra-uterino pode ser a única anomalia ecográfica que sugere infeção. Além destes sinais, os mais típicos são as lesões cerebrais, como por exemplo a microcefalia, a ventriculomegália, a vasculite dos núcleos talâmicos e dos núcleos centrais cinzentos (descritos sob o termo de “imagens em candelabro”), ou hiperecogeneidades punctiformes do parênquima cerebral ou das regiões periventriculares. [56], [57]

Nas primeiras 3 semanas de vida de recém-nascidos com infeção congénita ou perinatal, a excreção do CMV na urina e saliva é prolongada e intensa. O diagnóstico de infeção congénita por CMV no recém-nascido é feito nas primeiras 3 semanas através da pesquisa do vírus ou do genoma viral na urina ou saliva [51], [52]. O método mais sensível e específico no diagnóstico de infeção congénita era o isolamento do CMV em fibroblastos humanos (cultura celular), sendo este o método de referência [58].

Contudo, o método continha limitações que já foram referidas, porque além de moroso e dispendioso pode também acontecer que as células fiquem inviáveis e/ou haja uma perda de infetividade das amostras, reduzindo a sensibilidade da técnica. Para evitar estas limitações, a cultura celular tem vindo a ser substituída pela PCR. [7]. Para além do prazo das 3 semanas, é possível fazer um diagnóstico de infeção congénita através da análise do DNA do CMV em amostras de sangue colhidas em cartões de papel *Guthrie cards* ou teste do pezinho, como é habitualmente designado. Estas

amostras são recolhidas rotineiramente a todos os recém-nascidos nos seus primeiros 3-5 dias de vida, com o fim de diagnosticar doenças metabólicas e hereditárias. A utilização destes cartões para pesquisa de DNA do CMV por técnicas de PCR, possibilitou o diagnóstico retrospectivo do agente etiológico de sintomas semelhantes da infecção congénita por CMV, como a perda auditiva ou encefalopatias [59].

No entanto com todos estes testes de diagnóstico de infecção congénita, uns dos principais fatores condicionantes é o custo elevado de cada técnica, visto que é preciso um teste de diagnóstico para cada recém-nascido. Em 2005, no sentido de contrariar essa limitação, foi desenvolvido um método que possibilita a diminuição do número das PCR numa população em estudo, com recurso a *pools* de amostras de urina de recém-nascidos. O princípio deste método consiste que a quantidade de carga viral é tão elevada na urina de um recém-nascido, já anteriormente referido, que é possível detetá-la por técnica de PCR em tempo real, mesmo que essa urina esteja diluída em 19 urinas negativas [60].

Técnica de PCR

Kary Mullis desenvolveu a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em 1980, que tem como base a utilização da capacidade da DNA polimerase para sintetizar uma nova cadeia de DNA complementar para a cadeia que serve de molde. Como a DNA polimerase só pode adicionar um nucleótido se existir um grupo 3'OH, então é necessário um *primer* (pequenas frações de cadeia simples de DNA, que complementam as sequências alvo) que permite a ligação do primeiro nucleótido. Este requisito faz com que se consiga delimitar a região específica que queremos amplificar numa dada sequência. No final da reação da PCR, a sequência específica será amplificada em milhares de cópias. A visualização da amplificação do produto é feita classicamente através de electroforese, visualizando o produto amplificado através da fluorescência do brometo de etídio [61].

Nested PCR é uma modificação da PCR convencional, consiste em duas amplificações por PCR, em que após ter amplificado o fragmento exterior em grande número (primeira PCR), pode-se prosseguir com a amplificação do fragmento menor/fragmento pretendido, por PCR (segunda PCR) com uma taxa de contaminação mínima. Também na *Nested PCR* a visualização do produto final é através de electroforese

[62].

A PCR em tempo real foi descrita pela primeira vez em 1993 por Higuchi e os seus colaboradores. A metodologia da PCR consiste num sistema de detecção, quantificação e amplificação de DNA e detecção de sinais fluorescentes, em uma única etapa. Existem dois sistemas de detecção, detecção não-específica e específica [63].

A detecção não-específica consiste em fluoróforos que se ligam a cadeias duplas de DNA, emitindo fluorescência que proporciona o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Um exemplo desta detecção é através de SYBR-Green®, que aumenta a sua fluorescência em mil vezes quando ligado ao DNA, proporcionando uma detecção sensível, no entanto não é muito específica. O uso deste tipo de detecção requer a realização de curvas de dissociação dos produtos de amplificação para que se possam detetar produtos inespecíficos existentes. A determinação das temperaturas de dissociação, ou de *melting* (T_m), permite distinguir produtos de amplificações diferentes, dependendo do conteúdo em guaninas e citosinas (%G+C) e também do comprimento do fragmento. A temperatura de *melting* ou dissociação é uma propriedade única, devido à composição nucleotídica e do tamanho do produto de amplificação. O SYBR-Green® liga-se a todas as moléculas de DNA de cadeia dupla, emitindo um sinal fluorescente de comprimento de onda definido. No entanto, produtos de amplificação inespecíficos e dímeros de *primers* também contribuem para a obtenção de sinal fluorescente (Figura 2).

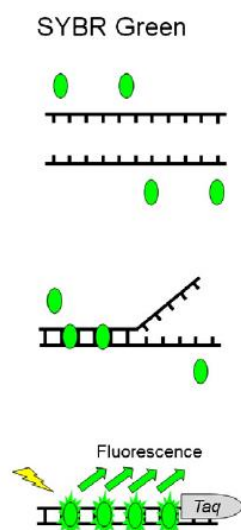


Figura 2- Princípio do funcionamento do SYBR-Green® (disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237093218_Quantitative_real-time_PCR_approaches_for_microbial_community_studies_in_wastewater_treatment_systems_Applications_and_considerations).

Na detecção específica com sondas de hidrólise, como as Taqman, utilizam-se sondas que consistem num *reporter* 5' (fluorescente) e num *quencher* 3' (silenciador).

Os produtos da reação da PCR são detetados pela fluorescência obtida após a ação da exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase, que liberta o fluoróforo *reporter* da sonda (Figura 3).

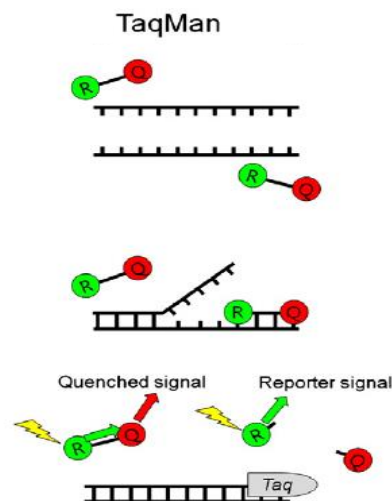


Figura 3- Princípio de funcionamento das sondas TaqMan® (disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237093218_Quantitative_real-time_PCR_approaches_for_microbial_community_studies_in_wastewater_treatment_systems_Applications_and_considerations).

A emissão da fluorescência fornece um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, os valores desta serão gravados durante cada ciclo e representam a quantidade do produto amplificado. *Cycle Threshold* (C_T) é o ciclo em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, permitindo a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Para a detecção da fluorescência é necessário um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um computador com um *software* para aquisição de dados e análise final da reação [64].

Para validar os resultados da PCR em tempo real, é necessário a presença de controlos positivos e negativos. Como controlo positivo deve-se utilizar ácido nucleico do microrganismo que se pretende identificar, enquanto o controlo negativo consiste habitualmente em água ou tampão e serve para demonstrar que os reagentes não estão contaminados com ácido nucleico alvo da reação.

Além dos controlos positivos e negativos, existem também os controlos internos, utilizados para demonstrar que a amostra não tem inibidores da reacção de PCR.

1.8. Objetivos do trabalho experimental

Este projecto experimental teve como objetivo principal rastrear recém-nascidos do Hospital da Luz e Maternidade Alfredo da Costa durante um 1 ano, no sentido de determinar a prevalência da infeção congénita pelo vírus citomegálico humano nessa população. O rastreio tem como base o diagnóstico da infeção congénita através de *pools* de amostras de urina, seguido de análise quantitativa de DNA viral por PCR em tempo real. Esta metodologia, descrita por uma equipa portuguesa, revelou anteriormente uma correlação total com os resultados obtidos pelo método de referência, a cultura celular, e permite uma redução bastante significativa, quer nos tempos de execução quer nos custos em reagentes, abrindo assim a possibilidade efetiva de utilizar esta técnica para o rastreio da infeção congénita.

O segundo objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um método para deteção de DNA viral do CMV directamente de uma fralda. Assim, a finalidade consistiu em demonstrar que é possível efectuar o diagnóstico da infeção congénita recorrendo a uma amostra de urina recolhida directamente de uma fralda. Esta técnica baseou-se num método de extração de DNA que é utilizado para os *guthrie cards*, e que aqui se aplica à urina retirada previamente da fralda, seguida da amplificação e deteção do DNA viral através de uma técnica de PCR em tempo real. Inicialmente foram utilizadas urinas CMV positivas do laboratório em fraldas imaculadas (secas), onde se testaram vários parâmetros, desde a extração de urina à extração do DNA viral. Por fim, foi efetuada a optimização da técnica e avaliada a sua sensibilidade.

2. Material e métodos

2.1. Rastreo Neonatal para CMV com recurso à utilização de *pools* de urina

2.1.1. População em estudo

A população de estudo foram 900 amostras de urina, das quais 838 foram recolhidas de recém-nascidos que nasceram no Hospital da Luz/Lisboa entre 16 de Setembro de 2014 e 16 de Setembro de 2015 e 62 de recém-nascidos nascidos na Maternidade Alfredo da Costa (MAC) entre 11 de Outubro e 17 de Dezembro de 2015.

2.1.2. Amostras

Após solicitação da autorização parental para a participação do rastreio, as enfermeiras recolheram a urina utilizando sacos pediátricos colectores de urina. Os sacos colectores com a urina foram colocados em frascos de 50mL e guardados a 4°C. Cada amostra de urina foi codificada com um número sequencial, sendo assim garantida a confidencialidade da identificação do recém-nascido. O transporte das amostras até à Faculdade de Ciências Médicas (FCM) foi efetuado numa caixa térmica. Na FCM as urinas foram transferidas para tubos de congelação, permanecendo a 4°C até à extracção.

2.1.3. Processamento das amostras

Todas as técnicas foram feitas de acordo com as normas de segurança instituídas no laboratório: utilizou-se material estéril e trabalhou-se na camara de segurança biológica.

Preparação das *pools*

As urinas já numeradas foram divididas em grupos de 20. As *pools* foram efetuadas misturando quantidades iguais, isto é, 10µL de cada uma das urinas, perfazendo os 200µL necessários para a extracção. Todas as amostras individuais foram congeladas a -20°C.

O rastreio de CMV cong nito foi efetuado através de uma técnica de biologia molecular. Através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRtr) foi determinada a quantidade de DNA de CMV nas urinas.

2.1.4. Extração de DNA

A extracção do DNA do CMV foi efectuada utilizando o *Jet Quick Genomic DNA Purification kit (Genomed GmbH)*, segundo o procedimento:

1. Pipetar 200 L da amostra num tudo estéril de 1,5mL;
2. Pipetar 20 L da proteinase K, 10 L da RNase e 200 L do tampão K1. Agitar entre cada reagente;
3. Agitar no vortex. Incubar 10 minutos a 58 C;
4. Fazer um *spin* para evitar contaminações;
5. Adicionar 200 L de etanol absoluto e de imediato agitar para prevenir a precipitação do DNA;
6. Preparar a coluna micro-*spin* e um tubo de recolha fornecidos pelo *kit*;
7. Aplicar a mistura anterior na coluna micro-*spin*;
8. Centrifugar 1min. a 10 000g   temperatura ambiente;
9. Rejeitar o líquido;
10. Lavar a coluna com 500 L de tampão Kx;
11. Centrifugar 1min. a 10 000g   T.A;
12. Rejeitar o líquido;
13. Lavar a coluna com 500 L de tampão K2;
14. Centrifugar 1min. a 10 000g   T.A;
15. Rejeitar o líquido;
16. Centrifugar a coluna vazia durante 1 min. a 16 620g, para secar completamente a sílica;
17. Inserir a coluna num novo tubo estéril de 1,5mL;
18. Pré-aquecer o Tris-HCl a 70 C durante 1min;
19. Eluir o DNA com 50 L de Tris-HCl pré-aquecido (pipetar no centro da sílica sem tocar nela);
20. Deixar repousar durante 5 min;
21. Centrifugar 2min. a 10 000g   T.A;

22. Passar novamente os 50 L do eluado com o DNA pela coluna, para aumentar o rendimento da extracção (pré-aquecer este eluado a 70 C);
23. Deixar repousar durante 5 min;
24. Centrifugar 2min. a 16 500g   T.A;
25. Por último guardar o DNA extraído a -70 C.

2.1.5. PCR em tempo real

A PCRtr foi realizada no 7500 *Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem)* utilizando placas de 96 poços. Para detecção do DNA de CMV utilizaram-se *primers* e uma sonda específica para a região UL83 que codifica a fosfoproteína pp65 do genoma do CMV.

Primer forward: 5'-CCCTCCGGCAAGCTCTTT-3';

Primer reverse: 5'-CAGGTCCTCTTCCACGTCAGA-3'

Sonda : 5'-TGCACGTCACGCTGG-3'

Na sonda a extremidade 5' tem o *Reporter* FAM e na extremidade 3' apresenta um *Quencher* MGB.

Para os ensaios de PCR em tempo real utilizaram-se as seguintes concentrações por reacção:

- 1x TaqMan Universal PCR Master Mix
- 7  Molar de *primers* de CMV
- 0,3  Molar de sonda

O volume da mistura de PCRtr para cada reacção foi de 20 L,   qual foi adicionada 5 L de DNA.

O ciclo de amplificac  o da PCR em tempo real   constituído por um primeiro passo no PCRtr,   45 C durante dois minutos (necessário   ativação da enzima Uracil-N-glycosylase). Seguido de uma desnaturação inicial a 95 C durante 10 minutos e 45 ciclos de desnaturação a 95 C durante 15 segundos e hibridação a 60 C durante 1 minuto (Figura 4).

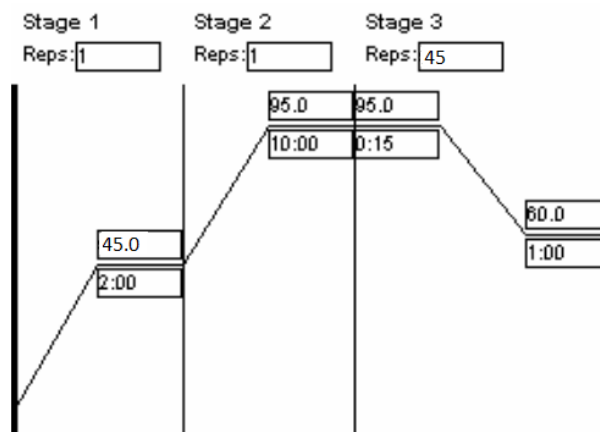


Figura 4 - Ciclo de amplificação da PCRtr. (Adaptado de [12]).

A análise quantitativa das *pools* e das amostras individuais foi feita através da extrapolação dos Ct numa curva de calibração efectuada a partir de diluições seriadas de uma suspensão com concentração conhecida de AD169. Os resultados são expressos em cópias/mL. Para excluirmos a existência de inibidores nas amostras, foi efectuado um controlo interno de cada amostra, utilizando uma diluição de AD169. Assim, num dos poços juntou-se 2µL da suspensão de AD169 com 5µL de amostra. Todas as urinas foram analisadas em duplicado e por cada série de PCRtr efectuou-se um controlo positivo, em que se utilizou 5µL da mesma suspensão de AD169 e um controlo negativo, em que se pipetou 5µL de água destilada.

A sensibilidade da técnica utilizada é de 496 cópias/mL (estudo anteriormente efetuado na FCM). O resultado das *pools* foi analisado de acordo com o algoritmo da figura 5.

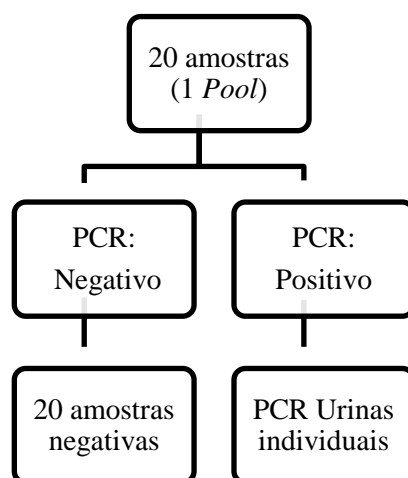


Figura 5 - Algoritmo utilizado na análise das *pools* de urina: quando o resultado da PCRtr das 20 urinas (*pool*) foi negativo, as 20 urinas são consideradas negativas; quando o resultado do PCRtr das 20 urinas foi positivo, realizou-se novo PCRtr com as 20 urinas individualizadas.

Sensibilidade das *pools*

Para testar a sensibilidade das *pools* foi feita a detecção da carga viral de CMV em diluições seriadas de uma *pool* obtida com 19 urinas negativas e uma urina positiva com carga de $4,79 \times 10^9$ cópias CMV/mL.

2.1.5.1. Critérios de validação e interpretação dos resultados de PCR em tempo real

Foram considerados os seguintes critérios para a validação e interpretação dos resultados de PCRtr:

- A diferença entre duplicados não diferir mais de 2 Cts
- As reações com amplificação, cujo Ct variava entre 15 a 45, consideraram-se como positivas;
- As reações sem amplificação são negativas.

2.1.6. Método de *Nested* PCR

A técnica de *Nested* PCR consiste na amplificação da região gp58 do genoma do CMV (Wakefield et al., 1992) utilizando dois pares de *primers*:

Primers externos

gB1 (5' - GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A -3')

gB2 (5' GTC GAC GGT GGA GAT ACT GCT GAG G -3')

Primers internos

gB3 (5' - ACC ACC GCA CTG AGG AAT GTC AG-3')

gB4 (5' - TCA ATC ATG CGT TTG AAG AGG TA-3')

Na primeira amplificação é utilizada a seguinte mistura de reagentes:

- Tampão da PCR [1x],
- $MgCl_2$ [1,5mM],
- dNTPs [0,2mM],
- Taq DNA Polymerase [1U/ μ L],
- *Primers* externos [0,25 μ M]

- Volume final 20 L

A qual se adicionou-se 5 L de extracto de DNA. Sendo o protocolo de amplifica o o seguinte:

- Desnaturaliza o durante dois minutos a 94 C
- 35 Ciclos: desnaturaliza o, 30 segundos a 94 C; hibrida o, 30 segundos a 55 C; extensão, 30 segundos a 72 C
- Extensão final, 5 minutos a 72 C.

Após a primeira amplifica o foi preparada uma nova mistura da PCR para ser utilizada na segunda amplifica o com as seguintes concentrações:

- Tampão da PCR [1x],
- MgCl₂ [1,5mM],
- dNTPs [0,2mM],
- Taq ADN Polymerase [1U/ L],
- *Primers* [0,25 M]
- Volume final 23 L

Adicionou-se 2 L dos amplificados da 1  reação. Sendo este segundo protocolo de amplifica o o seguinte:

- Desnaturaliza o durante dois minutos a 94 C;
- 30 Ciclos: desnaturaliza o, 30 segundos a 94 C; hibrida o, 30 segundos a 53 C; extensão, 30 segundos a 72  C;
- Extensão final, 5 minutos a 72 C.

Todas as urinas foram analisadas em duplicado.

Os produtos da *Nested* PCR são separados por eletroforese num gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio e analisados num transiluminador (luz ultravioleta), juntamente com um marcador de peso molecular de 100pb.

A *Nested* PCR foi utilizada como uma técnica de confirma o. A sua sensibilidade   de 431 cópias/ml (estudo anteriormente efetuado na FCM).

2.1.7. Determinação da prevalência da infeção congénita pelo vírus citomegálico humano nessa população

A determinação da prevalência foi obtida através do cálculo do intervalo de confiança para proporções, disponível em: <https://www.mccallum-layton.co.uk/tools/statistic-calculators/confidence-interval-for-proportions-calculator/>.

2.2. Detecção de CMV com recurso à utilização de fraldas

O estudo baseia-se na deteção de DNA de CMV directamente de uma fralda. Para tal, recolheu-se uma amostra de urina de fraldas de recém-nascidos.

2.2.1. Amostras

Numa primeira fase utilizou-se discos de fralda seca, embebidos no laboratório com urinas positivas. Numa segunda fase, utilizou-se discos cortados de fraldas de recém-nascidos que nasceram no Hospital da Luz/Lisboa (sem infeção congénita) às quais se adicionou previamente 1mL de uma urina positiva.

2.2.2. Processamento das amostras a partir de fralda seca

Preparação dos discos:

Cortou-se 3 discos com 1cm de diâmetro de uma fralda seca e embebeu-se com 3 mL de uma urina positiva (Figura 6).

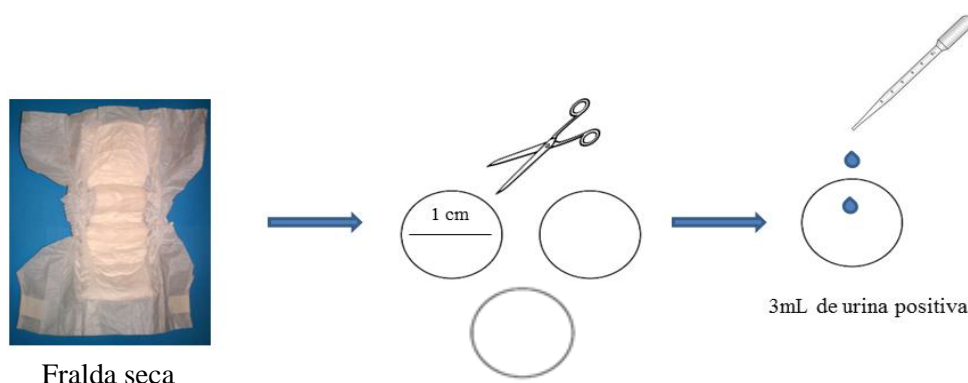


Figura 6 - Preparação dos discos com uma urina positiva.

Extração da urina dos discos:

O procedimento de extração baseou-se no protocolo efectuado no laboratório de Microbiologia (NMS/FCM) para extração do sangue seco do *Guthrie card* em Anexo II (Figura 7):

- Cortou-se o disco em duas metades;
- Colocou-se cada metade num microtubo de 1,5mL e emergiu-se com RPMI-meio de cultura celular (testou-se diferentes volumes - 500 L, 600 L, 700 L,750 L);
- Centrifugou-se 3 minutos a 10 000g;
- Recolheu-se para um microtubo o sobrenadante das duas metades do disco.

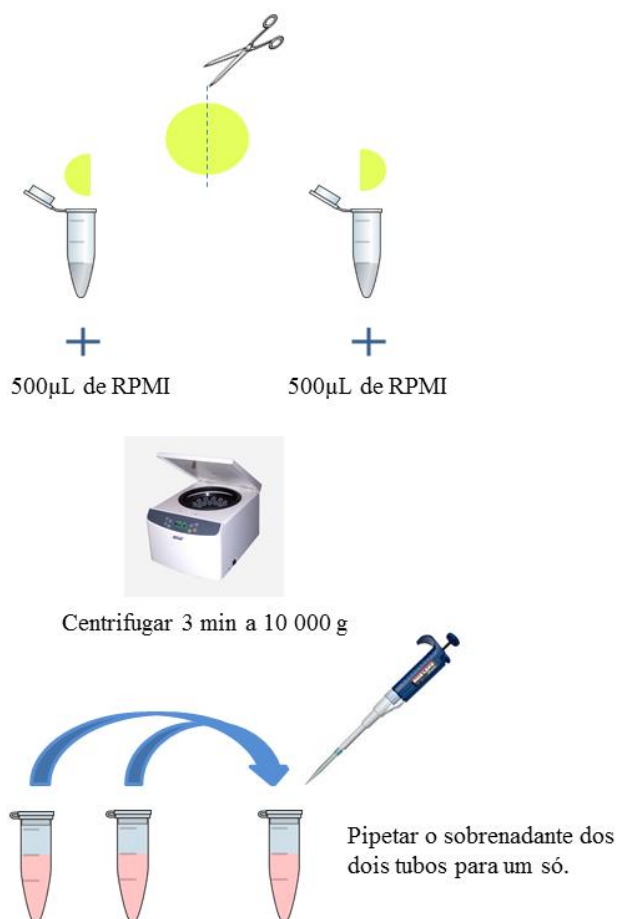


Figura 7 - Esquematização do processo de extração da urina da fralda.

Efectuou-se a extração do DNA utilizando o *Jet Quick Genomic DNA Purification kit* (Genomed GmbH), técnica descrita em 2.1.4.

Após a extracção efectuou-se a amplificação do DNA utilizando a técnica descrita em 2.1.5.

2.2.2.1. Estudo da sensibilidade

O estudo da sensibilidade foi efectuado repetindo o processo descrito em 2.2.2 utilizando diluições seriadas de urinas positivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}).

2.2.3. Processamento das amostras a partir de fralda de recém-nascido

Utilizou-se 1 disco cortado de cada fralda de recém-nascidos às quais se adicionou previamente 1mL de uma urina positiva (Figura.8).

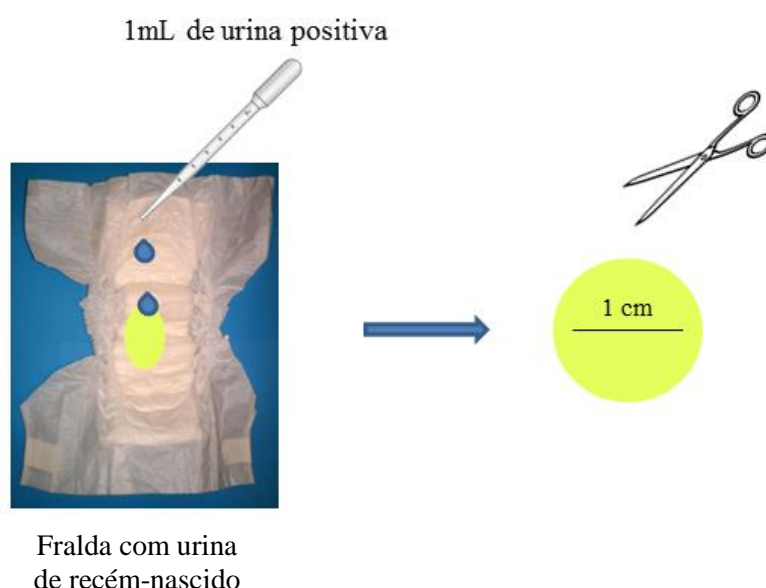


Figura 8 - Preparação dos discos a partir de uma fralda de recém-nascido à qual se adicionou uma urina positiva.

A técnica de extração de urina dos discos foi a mesma utilizada na primeira fase (Figura7), sendo efectuada após 12 horas (tempo de secagem). No entanto o volume de meio RPMI usado para emersão das metades do disco foi 700 μ L.

A extracção de DNA de CMV foi efectuada segundo o protocolo descrito em 2.1.4., seguida da amplificação pela técnica de PCRtr, descrita em 2.1.5.

3. Resultados e discussão

3.1. Rastreio Neonatal para CMV com recurso à utilização de *pools* de urina

Das 900 urinas recolhidas foram preparadas 45 *pools* com 20 urinas, tendo 41 *pools* sido negativas para CMV e 4 positivas. Em cada *pool* positiva detetou-se apenas uma amostra positiva (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da PCRtr das *pools* de urina e respetivas amostras individuais.

<i>Pool</i> (20 Urinas)	Resultado PCRtr (cópias/mL)	Amostras Individuais	Resultado PCRtr (cópias/mL)
1 – 13	Negativo	-	-
14	2,99x10 ⁷	14.1 - 14.18	Negativo
		14.19	4,46x10 ⁸
		14.20	Negativo
15 - 19	Negativo	-	-
20	2,27x10 ⁷	20.1	1,19x10 ⁸
		20.2 - 20.20	Negativo
21 - 26	Negativo	-	-
27	3,03x10 ⁶	27.1	Negativo
		27.2	2,25x10 ⁸
		27.3 - 27.20	Negativo
28 - 44	Negativo	-	-
45	6,69x10 ⁴	45.1 - 45.10	Negativo
		45.11	9,03x10 ⁶
		45.12 - 45.20	Negativo

Podemos observar que o número de cópias de CMV/mL da PCRtr das *pools* e das urinas positivas varia entre um e dois logs de 10. Nas *pools* 14 e 20 a carga é 10 vez menor que nas respectivas urinas positivas e nas *pools* 27 e 45 a diferença é de 100 vezes.

Para confirmação dos resultados das *pools* (20 urinas) retestamos as primeiras onze *pools* em *pools* (10 urinas) utilizando a mesma técnica, não se tendo observado

alterações. Na *pool* 11.1 (primeiro conjunto de 10 da *pool* 11) que apresentou resultados discordantes nos duplicados (Ct=38,44/Negativo) quando testadas as urinas individualmente o problema manteve-se em duas urinas (Ct=42,86/Negativo; Ct=42,76/Negativo) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados de PCRtr para as primeiras onze *pools* (20 urinas), e respectivas subdivisões em *pools* (10 urinas).

<i>Pool</i> (20 urinas)	Resultado da PCRtr	<i>Pools</i> (10 urinas)	Resultado da PCRtr	Urinas Individuais	Resultado da PCRtr
1-10	Negativo	1.1 - 10.2	Negativo	-	-
11	Negativo	11.1	Positivo/Negativo (Ct=38,44/Neg)	11.1.1	Positivo/Negativo (Ct=42,76/Neg)
				11.1.2	Positivo/Negativo (Ct=42,86/Neg)
				11.1.3 - 11.1.10	Negativo
		11.2	Negativo	-	-

Na confirmação por *Nested* PCR destes resultados não concordantes obtiveram-se resultados negativos (Figura 9), confirmando-se o resultado inicial das *pools* (20 urinas).

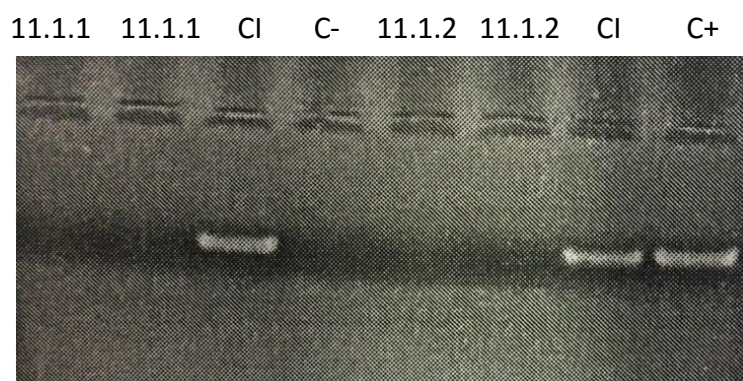


Figura 9 - Resultados da *Nested* PCR. Electroforese em gel de agarose a 1,5%, correspondentes às urinas 11.1.1 e 11.1.2, em duplicado, e respectivos controlos internos (CI), controlo negativo (C-) e positivo (C+; AD-169).

Na figura 10 estão representados os resultados obtidos no estudo da sensibilidade das *pools* confirmando-se a linearidade da detecção.

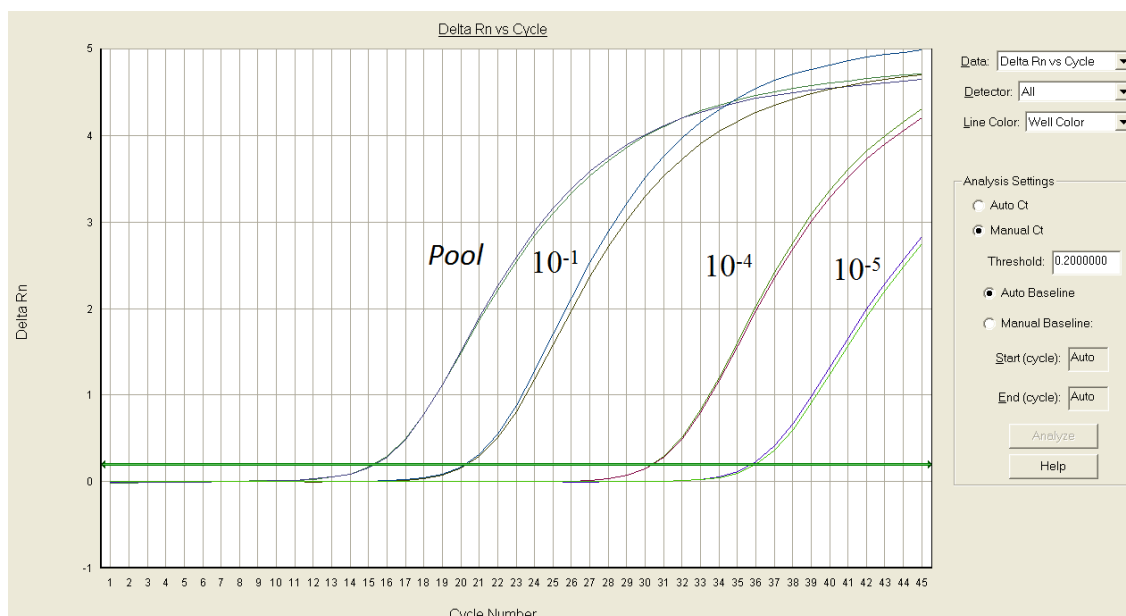


Figura 10 - Resultados da PCRtr de diluições seriadas de uma *pool* positiva com uma carga inicial de $4,79 \times 10^9$ cópias/mL em que foi possível a detecção até à diluição 10^{-5} com uma carga correspondente de $3,73 \times 10^3$ cópias/mL.

De acordo com os critérios descritos em 2.1.7., a prevalência do rastreio de infecção congénita pelo CMV com recurso à utilização de *pools* de urina é 0,44% (intervalo de confiança para 95%: 0,01-0,87).

No que diz respeito aos resultados obtidos, a prevalência encontra-se nos intervalos descritos na literatura [8], [65]. No entanto, em comparação com o rastreio nacional que foi efetuado com recurso aos *guthrie cards*, o número de amostras positivas esteve abaixo do esperado. Para esta amostragem reduzida contribuíram alguns contratempos, como a recusa dos pais em participar no estudo e o método de recolha de urina (sacos coletores) ser por vezes ineficaz com casos de amostras insuficientes.

Contudo, o rastreio de infecção congénita por CMV com recurso a *pools* de urina, consegue uma redução em 86% das reações de PCRtr, permitindo assim uma redução de custos que possibilita a sua utilização para programas universais de rastreio.

3.2. Detecção de CMV com recurso à utilização de fraldas

Para substituição dos sacos coletores na recolha de urinas, pensou-se em utilizar as próprias fraldas do recém-nascido. Este método seria muito mais prático, visto que, não

é preciso colocar nada extra na fralda, o que normalmente dificulta a recolha de urina por causa do incómodo e do método de colocar e retirar o saco coletor. Não permitirá, no entanto, a utilização de *pools* de amostras.

Até à extração de urina dos discos embebidos com várias diluições de uma urina positiva, após 12 horas de secagem, todo processo foi moroso e modificado algumas vezes. Num primeiro ensaio, o disco de fralda foi emerso em RPMI e sujeito a um choque térmico a 56°C; no entanto no final obteve-se discos sem amostra nenhuma a extrair. Desta forma, excluímos desde logo o choque térmico.

Outra das dificuldades foi acertar no volume de RPMI, uma vez que os polímeros superabsorventes existentes nas fraldas absorviam o meio e mais uma vez não havia amostra para extrair. O volume de 500µL foi o que mais satisfiz as nossas necessidades, o líquido que se conseguia extrair era $\geq 200\mu\text{L}$, quantidade necessária para a extração de DNA. Os resultados da PCRtr dos discos embebidos com diluições de uma urina positiva a partir de uma fralda seca, foram bastante concordantes (Tabela 3, 4, 5 e 6).

Tabela 3 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (D) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($3,2 \times 10^7$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: D1.1; D1.2; D1.3). Nas amostras negativas a extração e a PCRtr foram repetidas. (AI – Amostra insuficiente)

Experiência 4				
Diluição	Carga viral da diluição (cópias/mL)	Disco	Carga viral (cópias/mL)	
			1ª extração	2ª extração
10^{-1}	$1,7 \times 10^6$	D1.1	$1,2 \times 10^6$	-
		D1.2	Neg	$1,6 \times 10^5$
		D1.3	$1,3 \times 10^6$	-
10^{-2}	$2,5 \times 10^5$	D2.1	$1,2 \times 10^5$	-
		D2.2	$2,8 \times 10^5$	-
		D2.3	$9,7 \times 10^4$	-
10^{-3}	$3,8 \times 10^4$	D3.1	Neg	AI
		D3.2	Neg	$1,3 \times 10^4$
		D3.3	Neg	Neg/ $1,5 \times 10^3$
10^{-4}	$4,0 \times 10^3$	D4.1	$4,9 \times 10^3$	-
		D4.2	$2,8 \times 10^3$	-
		D4.3	$2,3 \times 10^2$	-

Na Tabela 3 não existe variação de log entre a carga viral da diluição da urina e a carga viral extraída dos discos da fralda. Nos discos D1.2, D3.1, D3.2 e D3.3 deve ter ocorrido um erro na primeira extração, visto que as diluições anteriores e posteriores a

estes apresentavam cargas virais detetáveis. Ao repetir a extração confirma-se que houve um erro de extração, pois os discos já apresentaram carga viral detetável.

Na Tabela 4, os valores da carga viral da diluição e dos discos mantêm-se praticamente iguais. Apenas uma amostra necessitou de uma segunda extração obtendo-se um resultado de acordo com a carga inicial da diluição.

Tabela 4 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (C) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($4,4 \times 10^5$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: C1.1; C1.2; C1.3). Nas amostras negativas a extração e a PCRtr foram repetidas.

Experiência 5				
Diluição	Carga viral inicial da diluição (cópias/mL)	Disco	Carga viral (cópias/mL)	
			1ª extração	2ª extração
10^{-1}	$4,1 \times 10^4$	C1.1	Neg	$1,6 \times 10^4$
		C1.2	$2,1 \times 10^4$	-
		C1.3	$1,9 \times 10^4$	-
10^{-2}	$1,1 \times 10^4$	C2.1	$2,6 \times 10^3$	-
		C2.2	$4,9 \times 10^3$	-
		C2.3	$2,0 \times 10^3$	-
10^{-3}	$1,1 \times 10^3$	C3.1	$1,1 \times 10^3$	-
		C3.2	Neg/ $1,8 \times 10^3$	-
		C3.3	Neg/ $9,0 \times 10^2$	-
10^{-4}	Neg	C4.1	Neg	-
		C4.2	Neg	-
		C4.3	Neg	-

Note-se que a partir da diluição 10^{-3} os resultados obtidos nos discos, começam a ser díspares e na diluição 10^{-4} já não são detetáveis, o que é explicado pelo limite de deteção da técnica (496 cópias/mL).

Na Tabela 5, como justificação para a carga viral inicial da urina ser muito mais elevada que a carga viral na diluição 10^{-1} (mil vezes maior), supõe-se que a urina possa ter estado muito tempo a 4°C , o que pode ter provocado degradação do DNA viral.

Tabela 5 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (A) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($3,2 \times 10^7$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: A1.1; A1.2; A1.3).

Experiencia 6			
Diluição	Carga viral inicial da diluição (cópias/mL)	Ensaio	PCRtr (cópias/mL)
			1� extração
10^{-1}	$7,2 \times 10^4$	A1.1	Neg
		A1.2	$4,4 \times 10^4$
		A1.3	$2,2 \times 10^3$
10^{-2}	$4,3 \times 10^3$	A2.1	Neg
		A2.2	Neg
		A2.3	$1,8 \times 10^3$
10^{-3}	$3,8 \times 10^2$	A3.1	Neg
		A3.2	$1,9 \times 10^3$
		A3.3	Neg
10^{-4}	$3,3 \times 10^2$	A4.1	Neg
		A4.2	Neg
		A4.3	$3,1 \times 10^2$
10^{-5}	Neg	A5.1	Neg
		A5.2	Neg
		A5.3	Neg

Os resultados da carga viral da diluição em comparação com a carga viral extraída dos discos nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} apresentam logs concordantes. Nestas diluições, os discos que deram negativos, não houve oportunidade para repetição por amostra insuficiente. No entanto a partir da diluição 10^{-3} já se esperava poucos resultados positivos, pois estas diluições encontram-se no limiar da sensibilidade.

Novamente na Tabela 6, os resultados entre as cargas virais das diluições da urina e as cargas virais extraídas dos discos de fraldas apresentaram-se similares. O disco B1.2 apresentou resultado negativo, mas não foi possível realizar-se uma segunda extração por amostra insuficiente. A partir da diluição 10^{-3} já se observam discos negativos, pois esta diluição já se encontra perto do limiar da sensibilidade da PCRtr.

Tabela 6 - Resultados da PCRtr dos discos de fraldas (A) embebidos com diluições seriadas de uma urina positiva ($3,9 \times 10^5$ cópias/mL de CMV). Para cada diluição embebeu-se 3 discos (ex: B1.1; B1.2; B1.3).

Experiencia 7			
Diluição	Carga viral inicial da diluição (cópias/mL)	Ensaio	PCRtr (cópias/mL)
			1ª extração
10^{-1}	1×10^5	B1.1	$4,5 \times 10^4$
		B1.2	Neg
		B1.3	$2,3 \times 10^4$
10^{-2}	1×10^4	B2.1	$6,3 \times 10^4$
		B2.2	$2,7 \times 10^3$
		B2.3	$5,2 \times 10^3$
10^{-3}	$1,1 \times 10^3$	B3.1	$4,6 \times 10^2$
		B3.2	Neg
		B3.3	Neg
10^{-4}	$4,0 \times 10^2$	B4.1	$5,0 \times 10^2$
		B4.2	Neg
		B4.3	Neg

Verificou-se que os resultados quando próximos do limite de detecção (469 cópias/ml) apresentam valores intermitentes nas réplicas, Positivo ($3,1 \times 10^2$, $4,6 \times 10^2$)/Negativo.

Numa segunda fase, foi feita a extração de urina através de fraldas de recém-nascidos às quais se adicionaram 1mL de uma urina positiva. Os resultados encontram-se expressos em cópias/mL na Tabela 7. Nesta experiência, o volume de RPMI utilizado para extração da urina da fralda foi de 700 μ L, sendo esta situação a que se poderá parecer mais com a realidade.

Tabela 7 – Resultados da PCRtr do disco recortado de cada uma das 7 fraldas com urina de recém-nascidos, às quais se adicionou previamente 1mL de uma urina positiva ($3,4 \times 10^6$ cópias/mL de CMV).

Fralda	Carga viral (cópias/mL)
1	$3,9 \times 10^3$
2	$7,3 \times 10^5$
3	$1,5 \times 10^6$
4	$1,9 \times 10^3$
5	$5,1 \times 10^3$
6	$4,5 \times 10^3$
7	$5,4 \times 10^4$

Na tabela 7, todas as urinas extraídas dos discos das fraldas utilizadas neste estudo apresentaram cargas virais superiores a 10^3 cópias/mL, embora 6 fraldas não tenham ficado na mesma ordem de grandeza.

A discrepância de resultados nas fraldas às quais foi adicionada uma urina com a mesma carga viral pode dever-se a vários factores, como a quantidade de urina absorvida na fralda (“se a fralda estava pouco ou muito molhada”) ou a coincidência exata entre o local onde se corta o disco e o local onde se adicionou o 1mL.

Os resultados obtidos na detecção de CMV com recurso   utilização de fraldas de recém-nascidos, mostraram que o método é exequível e que uma urina com carga superior a 10^3   sempre detetável, sendo que uma urina de um recém-nascido com infeção congénita por CMV normalmente superior a 10^5 cópias/mL. No entanto, na extração de DNA de CMV através de discos embebidos com urina positiva, as 3 réplicas nem sempre foram concordantes uma vez, podendo ter existido erros de extração.

Neste estudo, não foi possível testar o método de extração diretamente de fraldas de recém-nascidos com infeção congénita por CMV previamente diagnosticada, o que constituirá um próximo passo a efectuar na continuação do presente projecto.

Algumas equipas de trabalho, descritas na literatura, descreveram métodos de diagnóstico de infeção congénita por CMV em que a recolha de urina não foi feita através de sacos coletores. Em 2011, uma equipa japonesa fez um rastreio de infeção congénita por CMV usando amostras de urinas de recém-nascidos, recolhidas em papel de filtro colocadas nas fraldas [66], enquanto Ross e colaboradores em 2015 fizeram recolha de amostras de urina com bolas de algodão colocadas nas fraldas dos recém-nascidos [67].

No entanto, estes estudos, em comparação com a utilização de apenas fraldas dos recém-nascidos, implicam sempre a colocação de material na fralda, o que não acontece com o presente método.

4. Conclusões

Neste estudo, foi feito um rastreio neonatal para infeção congénita por CMV com o recurso à utilização de pools de urina (técnica desenvolvida por Paixão e colaboradores [60]). A prevalência deste estudo foi de 0,44%, apresentando-se dentro do intervalo citado na literatura, quer por equipas portuguesas, quer europeias. Embora o intervalo de confiança apresente uma grande variação devido ao reduzido número de amostras, estes resultados reforçam a importância que este vírus tem no contexto das infeções congénitas no nosso país.

O rastreio desta infeção durante a gravidez é discutido, há vários anos, sem consenso estabelecido. Grande parte dos países desenvolvidos não o recomenda, porque a maioria dos fetos infectados será saudável, o conhecimento acerca do prognóstico fetal e neonatal é escasso e não existe um tratamento válido, credível e seguro durante a vida fetal. Contudo, é possível rastrear a infeção congénita ou peri-natal num recém-nascido, como referimos em “Diagnóstico de infeção congénita ou peri-natal por CMV”. O rastreio através de *pools* de urina mostrou-se prático e economicamente viável, podendo ser um método rotineiro e universal. Segundo este estudo, o método das *pools* reduz 86% das reações de PCRtr e apresenta elevada sensibilidade, quando comparado com o método convencional em amostras isoladas.

Numa segunda fase, os resultados obtidos na extração de urina através de fraldas de recém-nascidos mostram-se muito promissores, sendo uma alternativa aos sacos coletores para a recolha de urina. A recolha de urina a recém-nascidos directamente das fraldas, mostrou ser um método prático, limpo, económico e sem os incómodos associados à recolha com os sacos colectores.

Em suma, para além da prevenção da infeção materna, só com a detecção de todos os casos de infeção congénita é que se conseguirá alguma diminuição do impacto da infeção congénita por CMV na população pediátrica nacional. Através do rastreio pós-natal conseguem-se detetar todos os casos de infeção congénita, permitindo uma deteção precoce das sequelas com possibilidade de as minimizar. Os dois objetivos desta dissertação apresentam resultados promissores no diagnóstico de infeção congénita por CMV, com a possibilidade de serem utilizadas em programas futuros.

5. Referências bibliográficas

- [1] Ho, M.. "The history of cytomegalovirus and its diseases.," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 197, no. 2, pp. 65–73, Jun. 2008.
- [2] Smith, M. G. "Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 92, no. 2, pp. 424–30, Jun. 1956.
- [3] Riley, H. D. "History of the cytomegalovirus.," *South. Med. J.*, vol. 90, no. 2, pp. 184–90, Feb. 1997.
- [4] Rowe, W. P., Hartley, J. W. Waterman, S. Turner, H. C. and Huebner, R. J. "Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 92, no. 2, pp. 418–24, Jun. 1956.
- [5] Craig, J. M., Macauley, J. C., Weller, T. H., and Wirth, P. "Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 94, no. 1, pp. 4–12, Jan. 1957.
- [6] Weller, T. H. "Review. Cytomegaloviruses: the difficult years.," *J. Infect. Dis.*, vol. 122, no. 6, pp. 532–9, Dec. 1970.
- [7] Revello, M. G. and Gerna, G. "Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant," *Society*, vol. 15, no. 4, pp. 680–715, 2002.
- [8] Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Vilarinho, L. and Os rio, R. V. "Prevalence of Human Cytomegalovirus Congenital Infection in Portuguese Newborns," *Euro Surveill*, Vol. 14, Issue 9, pp. 4–6, 2009.
- [9] Whitley, R. J. "Herpesviruses." University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [10] Gibson, W. "Structure and Assembly of the Virion," *Intervirology*, vol. 39, no. 5–6, pp. 389–400, 1996.
- [11] Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G., and Landini, M. P. "Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains.," *Rev. Med. Virol.*, vol. 14, no. 6, pp. 383–410, Jan. 2004.
- [12] Paixão, P. "Contributo para o estudo da infe o congénita pelo v rus citomegálico em Portugal," 2009. [Online]. Available: [http://run.unl.pt/bitstream/10362/5101/3/Paixao Paulo TD 2009.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/5101/3/Paixao%20Paulo%20TD%202009.pdf). [Accessed: 24-Jul-2015].

- [13] Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H., and Jahn, G. "Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues.," *J. Gen. Virol.*, vol. 76 (Pt 4), pp. 741–50, Apr. 1995.
- [14] Tavares, M. V., Domingues, A. P., Tavares, Malheiro, M. E., Tavares, F. and Moura, P. "Citomegalovírus Existe Lugar para o Rastreo Durante a Gravidez ?," *Acta Med Port*, Vol. 24, pp. 1003–1008, 2011.
- [15] "Vírus citomegálico humano.," *Secção Neonatologia da SPP*, no. Protocolos de Diagnóstico e Terapêutica em Infecçologia Perinatal, 2006.
- [16] Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R. F., Britt, W. J., Boll, T. J., and Alford, C. A. "The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status," *N. Engl. J. Med.*, vol. 326, no. 10, pp. 663–667, Mar. 1992.
- [17] Ahlfors, K., Ivarsson, S. A., Harris, S., Svanberg, L., Holmqvist, R., Lernmark, B. and Theander G. "Congenital cytomegalovirus infection and disease in Sweden and the relative importance of primary and secondary maternal infections. Preliminary findings from a prospective study.," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 2, pp. 129–37, Jan. 1984.
- [18] Schopfer, K., Lauber, E. and Krech, U. "Congenital cytomegalovirus infection in newborn infants of mothers infected before pregnancy.," *Arch. Dis. Child.*, vol. 53, no. 7, pp. 536–9, Jul. 1978.
- [19] Stagno, S., Pass, R. F., Cloud, G., Britt, W. J., Henderson, R. E., Walton, P. D., Veren, D. A., Page, F. and Alford, C. A. "Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome.," *JAMA*, vol. 256, no. 14, pp. 1904–8, Oct. 1986.
- [20] Stagno, S., Reynolds, D. W., Huang, E. S., Thames, S. D., Smith, R. J. and Alford, C. A. "Congenital cytomegalovirus infection.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 296, no. 22, pp. 1254–8, Jun. 1977.
- [21] Kenneson, A. and Cannon, M. J. "Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection.," *Rev. Med. Virol.*, vol. 17, no. 4, pp. 253–76, Jan. 2007.
- [22] Wang, C., Zhang, X., Bialek, S., and Cannon, M. J. "Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 52, no. 2, pp. 11–13, 2011.
- [23] Boppana, S. B., Fowler, K. B., Britt, W. J., Stagno, S. and Pass, R. F. "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus.," *Pediatrics*, vol. 104, no. 1 Pt 1, pp. 55–60, Jul. 1999.

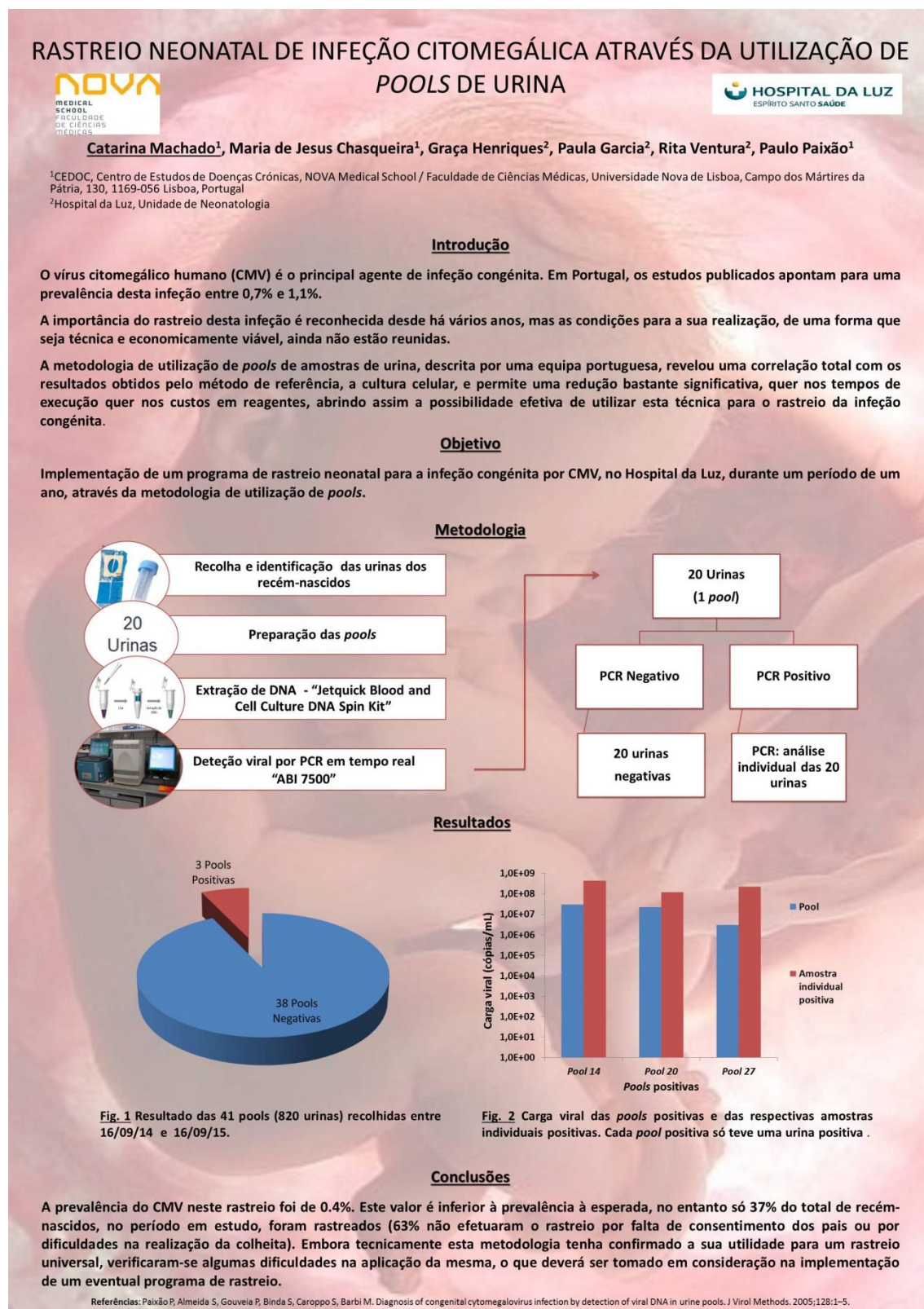
- [24] Boppana, S. B., Rivera, L. B., Fowler, K. B., Mach, M. and Britt, W. J. "Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity," *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 18, pp. 1366–71, May 2001.
- [25] Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E. and Alford, C. A. "Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission," *Clin. Obstet. Gynecol.*, vol. 25, no. 3, pp. 563–76, Sep. 1982.
- [26] Dollard, S. C., Grosse, S. D., and Ross, D. S. "New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection," *Rev. Med. Virol.*, vol. 17, no. 5, pp. 355–363, Sep. 2007.
- [27] Revello, M., Zavattoni, M., Baldanti, F., Sarasini, A., Paolucci, S. and Gerna, G. "Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns," no. *J Clin Virol.*, pp. 57–66, 1999.
- [28] Bello, C. and Whittle, H. "Cytomegalovirus infection in Gambian mothers and their babies," *J. Clin. Pathol.*, vol. 44, no. 5, pp. 366–369, 1991.
- [29] Zhang, X., Li, F., Yu, X., Shi, X., Shi, J. and Zhang, J. "Physical and intellectual development in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: a longitudinal cohort study in Qinba mountain area, China," *J. Clin. Virol.*, vol. 40, no. 3, pp. 180–5, Nov. 2007.
- [30] Ornoy, A. and Diav-Citrin, O. "Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy," *Reprod. Toxicol.*, vol. 21, no. 4, pp. 399–409, May 2006.
- [31] Hoover, D., Saah, A. and Bacellar, H. "Clinical manifestations of AIDS in the era of Pneumocystis prophylaxis, Multicenter AIDS Cohort Study." *The New England journal of medicine*. Vol. 329 (26), pp. 1922–6, 1993.
- [32] Mandell, J. E., Douglas, G. L., Bennett, R. G. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*, 5th ed. Philadelphia, 2000.
- [33] Boppana, S. B., Pass, R. F., Britt, W., Stagno, J. S. and Alford, C. A. "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 11, no. 2, pp. 93–9, Feb. 1992.
- [34] Mussi-Pinhata, M. M., Yamamoto, A. Y., Moura Brito, R. M., de Lima Isaac, M., de Carvalho e Oliveira, P. F., Boppana, S. and Britt, W. J. "Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 4, pp. 522–528, 2009.
- [35] Stagno, S. and Whitley, R. J. "Herpesvirus Infections of Pregnancy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 313, no. 20, pp. 1270–1274, Nov. 1985.

- [36] Oliver, S. E., Cloud, G. A., Sánchez, P. J., Demmler, G. J., Dankner, W., Shelton, M., Jacobs, R. F., Vaudry, W., Pass, R. F., Soong, S., Whitley, R. J. and Kimberlin, D. W. "Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system.," *J. Clin. Virol.*, vol. 46 Suppl 4, pp. S22–6, Dec. 2009.
- [37] Nyholm, J. L. and Schleiss, M. R. "Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects.," *Int. J. Womens. Health*, vol. 2, pp. 23–35, Jan. 2010.
- [38] Whitley, R. J. "Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 549, pp. 155–60, Jan. 2004.
- [39] Swanson, E. C. and Schleiss, M. R. "Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy.," *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 60, no. 2, pp. 335–49, Apr. 2013.
- [40] Lanari, M., Capretti, M. G., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Rizzollo, S., Mostert, M., and Manzoni, P. "Neuroimaging in CMV congenital infected neonates: how and when.," *Early Hum. Dev.*, vol. 88 Suppl 2, pp. S3–5, May 2012.
- [41] Schleiss, M. R. "Congenital cytomegalovirus infection: molecular mechanisms mediating viral pathogenesis.," *Infect. Disord. Drug Targets*, vol. 11, no. 5, pp. 449–65, Oct. 2011.
- [42] Stagno, S., Reynolds, D., Pass, R. and Alford, C. "Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection.," *N Engl J Med*, vol. 302, pp. 1073–1074, 1980.
- [43] Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R.F. "Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy.," *Pediatrics* Vol. 72, pp. 295–299, 1983.
- [44] Hamprecht, K., Witzel, S., Maschmann, J., Speer, C. P. and Jahn, G. "Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants. The role of cell free milk whey and milk cells.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 478, pp. 231–9, Jan. 2000.
- [45] Maschmann, J., Hamprecht, K., Dietz, K., Jahn, G. and Speer, C. P. "Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 33, no. 12, pp. 1998–2003, Dec. 2001.
- [46] Kimberlin, W.S., Lin, D.W., Sanchez, C.Y., Demmler, P.J. and Dankner G.J. "Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial," *J Pediatr*. pp. 16–25, 2003.
- [47] Griffiths, P. D. "Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation.," *Lancet. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 10, pp. 790–8, Oct. 2012.

- [48] Johnson, J., Anderson, B., and Pass, R. F. "Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection.," *Clin. Obstet. Gynecol.*, vol. 55, no. 2, pp. 521–30, Jun. 2012.
- [49] Shenk, T. E. and Stinski, M. F. Eds., *Human Cytomegalovirus*, vol. 325. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [50] Adler, S. P., Finney, J. W., Manganello, A. M. and Best, A. M. "Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women.," *J. Pediatr.*, vol. 145, no. 4, pp. 485–91, Oct. 2004.
- [51] Benoist, G., Jacquemard, F., Leruez-Ville, M. and Ville, Y. "[Cytomegalovirus (CMV) congenital infection].," *Gynécologie, Obs. Fertil.*, vol. 36, no. 3, pp. 248–60, Mar. 2008.
- [52] Malm, G. and Engman, M.L. "Congenital cytomegalovirus infections.," *Semin. Fetal Neonatal Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 154–9, Jun. 2007.
- [53] Lazzarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L. and Landini, M. P. "New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection.," *J. Clin. Virol.*, vol. 41, no. 3, pp. 192–7, Mar. 2008.
- [54] Grangeot-Keros, L. "Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection," *J. Clin. Virol.*, vol. 21, no. 3, pp. 213–221, Jun. 2001.
- [55] Ross, S. A. and Boppana, S. B. "Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis.," *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 1, pp. 44–9, Jan. 2005.
- [56] Picone, O., Simon, I., Benachi, A., Brunelle, F. and Sonigo, P. "Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection.," *Prenat. Diagn.*, vol. 28, no. 8, pp. 753–8, Aug. 2008.
- [57] Benoist, G., Salomon, L. J., Mohlo, M., Suarez, B., Jacquemard, F. and Ville, Y. "Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging.," *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 32, no. 7, pp. 900–5, Dec. 2008.
- [58] Rawlinson, W. D. "No TitleDiagnosis of human cytomegalovirus infection and disease," vol. Number 50, no. Pathology, pp. 109–15, 1999.
- [59] Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Caroppo, S., Dido, P. and Guidotti, P. "Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital CMV infection.," *J Clin Virol*, vol. 17, pp. 159–65, 2000.
- [60] Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Binda, S., Caroppo, S. and Barbi, M. "Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools," *J. Virol. Methods*, vol. 128, pp. 1–5, 2005.

- [61] Mullis, K. B. "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction,," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 48, no. 8, pp. 579–82, Jan. 1990.
- [62] Porter-Jordan, K., Rosenberg, E. I., Keiser, J. F., Gross, J. D., Ross, A. M., Nasim, S. and Garrett, C. T. "Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA," *J. Med. Virol.*, vol. 30, no. 2, pp. 85–91, Feb. 1990.
- [63] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions,," *Biotechnology. (N. Y.)*, vol. 11, no. 9, pp. 1026–30, Sep. 1993.
- [64] Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. and Gelfand, D. H. "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase,," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 16, pp. 7276–80, Aug. 1991.
- [65] Revello, M. "Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection," *J. Clin. Virol.*, vol. 29, no. 2, pp. 71–83, Feb. 2004.
- [66] Koyano, S., Inoue, N., Oka, A., Moriuchi, H., Asano, K., Ito, Y., Yamada, H., Yoshikawa, T. and Suzutani, T. "Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study,," *BMJ Open*, vol. 1, no. 1, p. e000118, Jan. 2011.
- [67] Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Stewart, A. Bernstein, D. I., Feja, K., Novak, Z., Fowler, K. B. and Boppana, S. B. "Urine Collection Method for the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection,," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 34, no. 8, pp. 903–5, Aug. 2015.

Anexo I



Anexo II

Técnica de extração de DNA para *Guthrie cards*

1º Dia

- Cortar todo o cartão em pedaços.
- Colocar estes pedaços de cartão num tubo de 1,5mL e emergi-los em 180 mL de MEM.
- O cartão é deixado em contato com o MEM durante um dia no frigorífico (4°C).

2º Dia

- Procede-se à extração do DNA por choque térmico, aquecimento dos tubos a 56°C durante 60 minutos, seguido de 99°C durante 7 minutos.
- Após centrifugação a 10 000xg durante 1 minuto, o sobrenadante é separado e congelado a -80°C até ao dia seguinte.